

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 24520121153131

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

**miR-192-5p 参与 SCN5A 基因 3' UTR
调控机制的研究**

**Post-transcriptional regulation of cardiac arrhythmia gene *SCN5A*
expression and function by miR-192-5p**

侯玉溪

指导教师姓名: 黄峥嵘副教授

专 业 名 称: 内科学

论文提交日期: 2015 年 4 月

论文答辩日期: 2015 年 5 月

2015 年 6 月

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘 要

目的:通过双荧光素酶报告基因载体实验验证我们前期预测的 miR-192-5p 能否调控 SCN5A 基因 3' UTR 区域。之后我们又研究了 miR-192-5p 对钠通道电生理性质的影响以及对 SCN5A 基因转录和蛋白表达的影响,探索 miR-192-5p 在 SCN5A 基因调控中的作用,为研究此类疾病的发病机制和防治提供新的思路。

方法: 1. 构建荧光素酶报告基因 pMIR-REPORT-SCN5A-3'UTR-T 或 pMIR-REPORT-SCN5A-3'UTR-C, 再将报告基因和 miR-192-5p 或阴性对照 NC-miRNA 以及 pRL-TK 载体共转入 HCT116 细胞,使用 Dual-Glo 荧光素酶检测试剂盒检测荧光素酶活性。

2. 构建重组质粒 PHL-hH1-SCN5A-3'-UTR。

3. 利用全细胞膜片钳记录技术检测 miR-192-5p 对钠电流的影响。

4. 利用实时荧光定量 PCR 技术来检测 miR-192-5p 对 SCN5A 基因 mRNA 水平的影响。

5. 利用 Western blot 技术来检测 miR-192-5p 对 SCN5A 基因蛋白表达水平的影响。

结果: 1. DNA 测序证实重组基因 pMIR-REPORT-SCN5A-3'UTR-T, pMIR-REPORT-SCN5A-3'UTR-C 和 PHL-hH1-SCN5A-3'-UTR 构建成功。

2. 与无义 miRNA 相比,转染 miR-192-5p 后可使荧光素酶报告重组子 pMIR-REPORT-SCN5A-3'UTR-T 或 pMIR-REPORT-SCN5A-3'UTR-C 的荧光素酶活性降低 40%-50%左右。

3. 全细胞膜片钳记录技术测得结果分析, miR-192-5p 与无义 miRNA 相比能够显著降低钠电流密度且下降比例达 40%。

4. 实时定量 PCR 结果分析: 通过在 SW620 细胞中转染 miR-192-5p 以及 NC-miR, 来检测内源性 SCN5A 基因表达水平并评估 SCN5A 基因的 mRNA 表达水平。其结果表明,与对照组相比,miR-192-5p 能够显著降低 SCN5A mRNA 的水平,虽然减少的幅度只有 17% (P 值= 0.0064)

5. Western blot 实验结果分析：通过在 SW620 细胞中转染 miR-192-5p 以及 NC-miR，并从转染过的 SW620 细胞中提取蛋白。结果表明，miR-192-5p 能够调控 Nav1.5 蛋白的表达水平，与无义 miRNA 相比，Nav1.5 的水平显著降低了 66% ($P = 0.0023$)

结论：1. 我们证明了 SCN5A 的 3'-UTR 中含有的靶结合位点 miR-192-5p，且能够下调 SCN5A 的表达。

2. miR-192-5p 能够影响钠电流，使电流密度降低。

3. miR-192-5p 能够降低 SCN5A 的 mRNA 水平。

4. miR-192-5p 能够显著减少 SCN5A 编码的钠通道蛋白 Nav1.5 的表达。这些结果都表明 miR-192-5p 在 Nav1.5 的转录后调控起着重要作用，为由 SCN5A 基因引起的心律失常疾病提供了新的靶点。

关键词：miR-192 SCN5A Brugada 综合征 膜片钳技术

Abstract

Objective

To explore whether the 3'-UTR of SCN5A contains a target binding site for miR-192-5p, we carry on the experiment of dual luciferase reporter. And explore the effects of miR-192-5p on transcription and expression of the SCN5A. We find the role of miR-192-5p in the SCN5A in order to provide new ideas of pathogenesis and the prevention of these diseases.

Methods

1. Constructed the reporter gene pMIR-REPORT-SCN5A-3'UTR-T or pMIR-REPORT-SCN5A-3'UTR-C, transfected reporter gene and miR-192-5p mimics or negative control NC-miRNA mimics, along with pRL-TK vector. Luciferase assays were performed by using the Dual-Glo luciferase assay kit.
2. Constructed the pHL-hH1-SCN5A-3'-UTR to explore how miR-192-5p regulate transcription and expression of SCN5A.
3. Detected the different levels of the sodium currents of SCN5A when miR-192-5p and NC-miR transfected in HEK293 cell by the whole-cell patch-clamp recording.
4. Detected the different levels of mRNA of SCN5A when miR-192-5p and NC-miR transfected in SW620 cell by RT-PCR and Western blot;
5. Detected the different expression of protein of SCN5A when miR-192-5p and NC-miR transfected in SW620 cell by Western blot

Result

1. DNA sequencing results confirmed that Reporter gene pMIR-REPORT-SCN5A-3'UTR-T、pMIR-REPORT-SCN5A-3'UTR-C and pHL-hH1-SCN5A-3'-UTR are successfully constructed.
2. Compared with the NC-miRNA, miR-192-5p can regulates the expression of SCN5A by targeting the 3'-UTR. The luciferase activity was reduced by about 40%

-50%.

3. Whole-cell patch-clamp recording : compared with NC-miR , miR-192-5p mimics significantly reduced the sodium current density by 40%

4. Real-time quantitative PCR : compared with NC-miR , miR-192-5p mimics significantly reduced the level of *SCN5A* mRNA, although the magnitude of reduction was only 17% ($P = 0.0064$)

5. Western blot: compared with NC-miR , miR-192-5p mimics significantly reduced the expression level of Nav1.5 protein by 66% compared with the negative control mimics ($P = 0.0023$)

Conclusion

Our results in this study for the first time demonstrate that expression of cardiac sodium channel gene *SCN5A* and its function can be regulated at the epigenetic, posttranscriptional level by miRNAs. We have also identified a novel role and downstream target for miR-192-5p in cardiac physiology. This study provides important insights into posttranscriptional regulation of cardiac ion channels by miRNAs and suggests that miR-192-5p may be an attractive target for novel antiarrhythmia therapies for treating cardiac diseases with reduced *SCN5A* expression and decreased I_{Na} density as in AF, heart failure, myocardial ischemia, BrS and other arrhythmias.

Keywords: miR-192 ; *SCN5A*; Brugada syndrome; patch-clamp technique

目 录

第一章 前言.....	1
第二章 MIR-192-5p 对 SCN5A-3' UTR 作用的研究.....	6
2.1 概述.....	6
2.2 材料和方法.....	6
2.3 实验结果.....	14
第三章 MIR-192-5P 调控 SCN5A 基因表达的研究.....	17
3.1 概述.....	17
3.2 材料和方法.....	17
3.3 实验结果.....	34
第四章 讨论.....	38
第五章 结论.....	43
英文缩略词表.....	44
参考文献.....	46
致 谢.....	51

Table of Contents

Chapter1 Introduction	1
Chapter2 The role of miR-192-5p on SCN5A	6
2.1 Overview	6
2.2 Material and method	6
2.3 Result	14
Chapter3 How miR-192-5p regulate the functional of SCN5A	17
3.1 Overview	17
3.2 Material and method	17
3.3 Result	34
Chapter4 Discussion	38
Chapter5 Conclusion	43
Abbreviation	44
Reference	46
Acknowledgement	51

第一章 前言

MicroRNA (miRNA) 是一类内源性 19-25 个核苷酸大小的短序列的非编码 RNA 分子^[1], 在进化中具有高度保守性, 它们广泛存在于真核生物中, 并且参与几乎所有的生命学过程, 例如细胞的增殖发育、细胞分化以及凋亡, 目前比较认可的 microRNA 参与生命过程的方式为, 它们通过与目标 mRNA 分子的 3' 端非编码区 (3' UTR) 互补配对导致 mRNA 分子稳定性和翻译受到抑制。

自 1993 年 Lee 在秀丽隐杆线虫(*C. elegans*)中发现(RNA)lin-4^[2], 它是一种核糖核酸, 它可生成一对小的 RNA 转录本但并不编码蛋白, 并且每个转录本都能通过在翻译水平上抑制 lin-14 (一种核蛋白) 的表达来调节幼虫的发育, 由此发现了第一个 miRNA, 并命名为 Lin-4。2000 年, Reinhart 等在研究线虫发育调控时又发现了 let-7^[3], 这时 miRNA 家族也正式进入人们的视野中。后来, 人们又在众多生物体内陆续发现了这种小分子的 RNA, 并将它们统称为微小 RNA (MicroRNA), 自发现伊始, miRNA 在生物体发育、肿瘤发生以及一些疾病的发病机制中起重要作用不断被发现: microRNA 在肿瘤的发病机制中研究的比较多, Adams BD 等发现了 miR-206 在乳腺癌的发病中的作用^[4], 随后 McCarthy JJ 又报道了 miR-206 在胚胎期骨骼肌的形成中发挥重要作用^[5]。Negrini M 也发现了与乳腺癌相关的 miRNA 并对其发病机制进行了详尽报道^[6]。microRNA133 在胰腺癌与舌癌的病患中出现表达下调的情况, 但是其在肌肉的形成过程中是上调的, 并证实它的表达具有肌肉特异性^[7, 8]。根据 Saetrom P 等人的报道 microRNA-125 在前列腺癌^[9]与乳腺癌^[10]的发病过程中都发挥了负调控的作用。Song B 等研究了 miR-140 在骨肉瘤和结肠癌发病中的作用^[11], 另 Nakajima G 等发现 let-7g 也在结肠癌的发病中发挥了作用^[12]。

近年来, miRNA 在心血管疾病的调控作用备受关注成为研究热点^[13, 14]。Zhao 等研究发现, miR-1 可适时阻止 Hand2 蛋白的合成, 调控心脏发育^[15], 该研究有助于人类了解心脏发育机制并为先天性心脏病的诊疗提供了新的思路; 一系列的研究发现, 在心肌特异表达 miRNA, 如 miR-1、miR-133a^[16]、miR-195 以及 miR-208 在心肌生长的调控中发挥作用, 表明 miRNA 在心肌肥厚的发生中也起重要作用

[17, 18]; Van Rooij 等研究发现 miR-208 与心力衰竭的发生有关系^[19], Duister RF 等发现 mi-133 和 miR-30 在心肌肥厚和心衰的发病机制发挥重要作用^[20], Thum T 等发现 miR-21 影响心肌成纤维细胞信号转导, 从而导致心肌肥厚和心衰的发生^[21], 提示控制 miRNA 表达可以成为心力衰竭治疗的潜在策略。2010 年, 意大利学者发现在急性心肌梗死患者中 miR-1, -133a, -133b 和-499-5p 表达上调, 而 miR-122 和 miR-375 表达下调, 提示 miRNA 可能成为心肌损伤的新指标^[14]。在心律失常领域, miRNA 的研究尤其活跃。Xiao 等研究发现在糖尿病患者心脏中 miR-133 抑制 HERG 基因的表达, 降低了快速激活的延迟整流钾通道 α 亚基的合成并造成缓慢去极化^[22]; Luo 等发现 miR-133 同时也抑制 KCNQ1 基因的表达, 降低了慢激活的延迟整流钾通道的合成从而导致心律失常的发生^[23]; 他们还发现 miR-1 和 miR-133 可以抑制编码起搏电流的基因 HCN2 和 HCN4, 从而发挥抗心律失常作用^[16]。Shan 等发现 miRNA 与房颤的发生有关^[24]; 潘振伟等发现 miRNA 可能与缺血预适应介导的抗心律失常作用有关^[25]; 2007 年, Yang 等^[13]在 *Nature Medicine* 发表文章首次报道 miRNA (miR-1) 是心律失常的致病因子, 而且会使心律失常加重, 该研究进一步发现 miR-1 导致心律失常的靶点, 是负责心肌细胞间电传导的间隙连接蛋白 43 (connexin43) 和调节钾电流的 Kir2.1^[13]。2010 年, Lu 等发现 miR-328 通过作用于 L 型钙离子通道可致心房不良重构, 该研究揭示了房颤的一种新的分子机制, 且 miR-328 是房颤的潜在治疗靶点^[26], 上述重大发现提示 miRNA 在多种心律失常疾病中发挥重要作用。

Brugada 综合征是一种常染色体不完全显性遗传性心脏病。是由西班牙的 Brugada 兄弟在 1992 年首次报道了一组病例, 该病例无器质性心脏病证据但具有室颤 (VF) 病史且心电图表现右束支传导阻滞和右胸导联 (V_1 - V_3) ST 段抬高表现, 后被命名为 Brugada 综合征^[27]。自 Chen 等通过 SSCP 技术和序列分析法在三个 Brugada 综合征患者家族中发现了 *SCN5A* 突变以来^[28], 已经发现十多个致病基因, 包括 *SCN5A*、*SCN1B*、*SCN2B*、*SCN3B*、*CACNA2D1*、*GPDL1*、*MOG1*、*CACNA1C*、*KCNE3*、*CACNB2*、*KCNJ8*、*KCND3*、*SLMAP* 等^[29]。但钠离子通道异常情况最为常见, 10% 以上的 Brugada 综合征患者携带 *SCN5A* 基因的突变, 且患者大部分都有家族史, 现已经发现了 300 多个突变^[30]。2002 年, 欧洲和美国心脏病学会联合召开会议制定了统一的临床诊断标准。2005 年, 对其进行了修

订,并对危险分层、药物及植入式除颤仪(ICD)治疗等做出详细的建议。**Brugada**综合征的特点有如下几个:首先,该病多发生于成年男性,男性发病率高于女性约8倍,猝死发生年龄平均(40 ± 15)岁,常发生于夜间睡眠时,临床表现多样,可能的临床表现有静息基因突变携带者、药物激发试验心电图异常者、晕厥反复发作等,甚至部分以猝死为首发表现^[31]。**Brugada**综合征病人的心电图是该病最重要的是诊断依据,特征性心电图改变有右胸导联(V_1-V_3)ST段呈抬高、伴或不伴有右束支传导阻滞。异常心电图有以下几种即下斜型、马鞍型和圆顶型。异常心电图可呈现动态改变,具有间歇性、多变性、隐匿性、非经典部位等特点。在药物、自主神经、发热等作用下可诱发出典型的BrS心电图改变^[31]。**Brugada**综合征的猝死率非常高,但是目前尚无有效的药物治疗方法,ICD是公认能防止猝死的唯一有效措施,所以植入ICD是治疗BrS患者的唯一有效手段。

1983年Cachelm等首次报道了心肌细胞 Na^+ 通道的研究结果。在心肌细胞上,去极化过程有无 Na^+ 通道的参与是产生快反应电位与慢反应电位的根本原因。心脏钠离子通道由核心亚基 α 亚基、辅助性 β 亚基、及多种调节蛋白所构成的蛋白复合体。**SCN5A**基因位于3号染色体,有28个外显子,是编码2016个氨基酸的电压门控性 Na^+ 通道 α 亚单位,分子量为227kD。**SCN5A**基因在人类心肌细胞高度表达,但在骨骼肌、肝脏及子宫中不表达。目前已发现的**SCN5A**基因存在上百个突变位点,并与之对应的一系列遗传性心律失常疾病^[32]。**SCN5A**相关疾病是一类具有遗传倾向容易发生恶性室性心律失常而猝死的心脏病,包括长QT-3型综合征,**Brugada**综合征,心脏传导障碍,病态窦房结综合征,心房颤动,扩张型心肌病等,此类疾病有一个共同特点是都与**SCN5A**基因的碱基改变(突变或单核苷酸多态性SNP)相关^[32]。**SCN5A**基因编码心肌细胞钠通道的 α 亚基,心肌细胞钠通道在动作电位的产生和冲动的传导过程中起关键作用,钠通道功能的改变容易导致严重的心率失常甚至猝死。目前发现,导致这类疾病的碱基改变(突变或SNP)多位于**SCN5A**基因编码区^[33, 34]。

心脏钠离子通道属于电压依赖性离子通道,主要是由一个功能性 α 亚基、四个辅助性 β 亚基以及一些相互作用蛋白组成的复合物。该通道在心肌细胞动作电位的起始、传播阶段起主要作用,**SCN5A**基因是心肌细胞钠通道 α 亚基(**Nav1.5**)的编码基因,该基因位于染色体3p21,含有4个同源结构域(D I -DIV),结构

域间由内环连接,每个结构域有 6 次跨膜螺旋(S1-S6),S4 感受膜电位的变化,称为电压感受器,S5 与 S6 连接区共同围成亲水性 P 环,是钠离子通过的孔道,P 环残基的改变会影响离子通道的选择性和通透性^[35]。钠离子通道的功能主要由 α 亚基完成,如通道开放、离子选择和通道快速失活等,但钠离子通道作为一个多蛋白组成的功能复合体离不开 β 亚基以及其他相互作用蛋白在通道的定位、转运、降解等作用的协助。其中目前已经发现 4 种 β 亚基,分别由 4 个基因 SCN1B-SCN4B 编码,与 α 亚基以二硫键或非共价键形式结合。 I_{Na} 是动作电位 0 相的主要离子流,Nav1.5 的 S4 跨膜段富含正电荷,为电压敏感区。在去极化期间 S4 发生跨膜移动,在快速失活过程中通道的区域是胞质循环连接的结构域 III 和结构域 IV 而导致通道的开放产生钠电流,通道在 1-2ms 之间迅速开放并在大约 10ms 之后就失活了(快速失活)钠通道的 C 端对通道的快失活也起着重要作用。其中某些部位活动异常,可导致该通道不全失活。 β 亚基对 α 亚基的调节主要是在调节钠通道的膜上表达和亚细胞定位方面^[36]。近年来,人们逐渐认识到 β 亚基作为辅助亚基对通道功能的重要性,如 β 亚基可以调节 α 亚基在细胞膜上的转运和定位、调节心肌 Na^+ 通道晚期电流^[37]。除此之外,基于 β 亚基突变所导致的疾病也逐步被纳入到基因-表型相互作用的研究中来,如 $\beta 1$ 亚基的突变所引起的恶性心律失常、Brugada 综合征和心脏传导等疾病^[38, 39]; $\beta 4$ 亚基的突变在先天性间期延长综合征中的研究等都表明辅助性 β 亚基的作用不可缺少^[13, 40]。功能辅助性 β 亚基的研究对阐述通道生理功能和疾病发病等方面都有重要意义。

近年来的研究表明 SCN5A 基因 5' UTR、启动子区域的碱基改变以及内含子剪切方式的改变在此类疾病中起着重要的作用。但到目前为止还未见 SCN5A 基因 3' UTR 的 SNP (C6995T) 与 Brugada 综合征相关,通过报告基因检测发现此 SNP 参与了 SCN5A 基因转录后的调控,由于该 SNP 位置特殊,加之既往研究表明 miRNA 参与了钾通道基因 (HERG、KCNQ1、Kir2.1)、起搏电流基因 (HCN2、HCN4)、L 型钙电流基因 (CACNA1C, CACNB1) 以及连接蛋白 43 (connexin43) 等基因的调控^[22],因此我们预测了该 SNP 位点附近区域可能也存在 miRNA 作用的靶点,为此,我们通过生物信息学预测该 SNP 位点附近区域与 miR-192-5p 作用的序列重叠。Lagos Quintana 等人首次发现并报道了 miR-192-5p^[13],后来由 Lim 等证明 miR-192-5p 在肾和肝细胞癌组织样品中是高

表达的^[41]。但是其在心脏组织中的表达并没有报道。

以上述发现为基础,本研究从 SCN5A 基因转录后调控模式入手,通过报告基因检测荧光素酶活性的变化来验证 SCN5A 基因 3' UTR 存在 miRNA 作用的靶序列;用膜片钳技术检测 miR-192-5p 对钠电流的影响;通过 Western blot、荧光定量 PCR 等技术研究其对 SCN5A 基因 mRNA 以及蛋白表达的影响,在研究中,我们发现了 miR-192-5p 可以结合 SCN5A 的 3'-UTR 并负调控 SCN5A 基因的 mRNA 和蛋白的表达,且降低钠电流的电流密度。这是第一个报道的作用于 SCN5A 基因的 miRNA。这也为研究相关疾病的发病机制和以 miRNA 为靶点设计药物进行此类疾病的靶向治疗提供新的思路。

第二章 miR-192-5p 对 SCN5A-3' UTR 作用的研究

2.1 概述

在前期研究中，我们在 Brugada 综合征病人中发现在 SCN5A 基因 3' UTR 中有一个新的 SNP (C6695T) 与 Brugada 综合征相关，通过生物信息学预测发现该 SNP 位点区域与一个 miRNA (miR-192) 作用的序列重叠。而研究 miRNA 的报告基因系统，是验证预测的 miRNA 能否调控靶基因最常用的研究方法之一。为了验证 SCN5A 能被 miR-192-5p 所抑制，在我们第一步研究中，将 SCN5A 基因 3' UTR 序列克隆入荧光素酶报告基因序列的下游，然后通过分析荧光素酶的活性，来验证 miR-192-5p 能够调控 SCN5A 基因。因此我们成功构建了含有 SCN5A 基因 3' UTR 萤火虫荧光素酶报告基因 pMIR-REPORT 下游，并将其与无义 miRNA/miR-192-5p 共转染进 HCT116 细胞中，运用双荧光素酶报告基因系统来检测两组荧光素酶活性，发现与无义 miRNA 相比，miR-192-5p 能够显著降低报告基因的荧光素酶活性，减少幅度达 40%，具有统计学意义。

2.2 材料和方法

2.2.1 实验材料

1. 载体构建

(1) miR-192 以及 NC-RNA 购于广州锐博生物公司 (广东 中国)

(2) 含 SCN5A 基因 3' UTR 区域的萤火虫荧光素酶报告基因 pMIR-REPORT、海参荧光素酶 pRL-TKVector (control 载体) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

2. 构建重组表达质粒

1) PCR 使用试剂

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.